

**Phylogenetic Analysis of Cytochrome Oxidase I from Buduk Toads
Duttaphrynus melanostictus and *Phrynooidis asper* from Bogor**

(Analisis Filogenetik Gen Sitokrom Oksidase I dari Kodok Buduk *Duttaphrynus melanostictus* dan *Phrynooidis asper* Asal Bogor)

Muhammad Dailami^{1*}, I Made Artika^{1,3}, Mirza Dikari Kusri², Dodi Safari³

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Department of Conservation of Forest and Ecotourism, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

³Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta, 10430, Indonesia

Received : 28 July 2015; Accepted: 14 Agustus 2016

Corresponding author: Muhammad Dailami; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +6285282971777; E-mail: muhdailami@gmail.com

ABSTRACT

Indonesia have high diversity of Amphibians. Amphibians have an important role in ecosystem and produce many bioactive peptides. However, the genetic information of amphibians from Indonesia is very limited, especially *Duttaphrynus melanostictus* and *Phrynooidis asper*. The aims of this study are to determine the nucleotide sequence of cytochrome oxidase I (COI) from *D. melanostictus* and *P. asper*, to analyze their genetic diversity and their phylogenetic relationship. A total 668 base pairs of COI gene fragment were successfully amplified and their nucleotide sequence determined. *P. asper* (5 haplotypes) samples group have high haplotype diversity compared to *D. melanostictus* (1 haplotype). The results of Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) to the NCBI and BOLD database, showed 99 % - 100 % identity to sequence of *D. melanostictus*. For the sequence of *P. asper* showed 99.23 % identity to sequence *P. asper* in BOLD database. There was no sequence of COI gene of *P. asper* in NCBI database. Genetic relationship among species in family Bufonidae, indicated that *D. melanostictus* has closer relation to *P. asper* than to another species, inspite of their pharapyletic characteristic. For intern species relationship of *D. melanostictus*, the data showed that *D. melanostictus* from Bogor have closer relationship to *D. melanostictus* from India than *D. melanostictus* from China.

Keywords: buduk toads, COI, phylogenetic, genetic diversity

ABSTRAK

Indonesia memiliki keanekaragaman amfibi yang tinggi. Amfibi memiliki peranan yang sangat penting dalam ekosistem dan dapat menghasilkan banyak peptida bioaktif yang bermanfaat bagi manusia. Akan tetapi, informasi genetik dari amfibi asal Indonesia masih sangat minim, termasuk jenis yang umum ditemukan di Indonesia yaitu *D. melanostictus* dan *P. asper*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sekuens gen sitokrom oksidase I (COI) dari *D. melanostictus* dan *P. asper*, menganalisis keragaman genetik serta hubungan filogenetiknya. Total 668 pasang basa fragmen gen COI berhasil diamplifikasi dan ditentukan urutan nukleotidnya. Kelompok sampel *P. asper* memiliki keragaman haplotype (5 haplotype) yang lebih tinggi dibanding kelompok *D. melanostictus* (1 haplotype). Hasil BLAST pada database NCBI dan BOLD sekuens *D. melanostictus* menunjukkan kemiripan 99 % - 100 % dengan sekuens *B. melanostictus*. Sekuens *P. asper* memiliki kemiripan 99.23 % dengan sekuens *P. asper* pada BOLD system. Hubungan kekerabatan antar spesies dari famili Bufonidae, menunjukkan *D. melanostictus* memiliki hubungan kekerabatan lebih dekat dengan *P. asper* dibanding spesies lainnya, namun kedua spesies ini bersifat paraphyletik. Hubungan kekerabatan intern spesies *D. melanostictus*, menunjukkan sampel *D. melanostictus* dari Bogor memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan sekuens *D. melanostictus* dari India, dibandingkan dengan sekuens dari China.

Kata kunci: kodok buduk, COI, filogenetik, keanekaragaman genetik

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman amfibi yang tinggi, sekitar 16 % spesies amfibi (dari 1100 spesies di seluruh dunia) dapat ditemukan di Indonesia (BAPPENAS 1993). Secara global, jumlah populasi amfibi di dunia semakin menurun. Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab menurunnya jumlah amfibi di Indonesia yaitu penangkapan berlebih (untuk dikonsumsi dan diperdagangkan), hilangnya habitat, pencemaran, penyakit, spesies introduksi dan juga kecacatan (Kusrini 2007). Penurunan jumlah amfibi ini akan menyebabkan hilangnya banyak informasi ilmiah yang belum dikaji terkait amfibi asal Indonesia. Salah satu informasi penting yang masih jarang ditemukan adalah informasi genetik dari amfibi tersebut. Jika ditelusuri pada database NCBI, jumlah sekuens atau informasi

genetik dari kodok dan katak asal Indonesia masih sangat jarang.

Kodok dan katak memiliki peranan yang sangat penting dalam ekosistem, diantaranya yaitu sebagai pemangsa berbagai jenis serangga dan beberapa hewan invertebrata (kontrol keseimbangan ekosistem) serta menjadi salah satu indikator kualitas lingkungan (García-Muñoz *et al.* 2010). Selain itu, sekresi kulit anura mengandung peptida bioaktif yang bermanfaat sebagai antimikroba, antikanker dan lainnya yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Beberapa senyawa peptida dari lendir anura yang memiliki aktifitas antimikroba yaitu senyawa peptida dari kelompok aurin, caerin, citropin, dahlein, maculatin, signiferin dan uperin (Pukala *et al.* 2006). Xu dan Lai (2015) merangkum seluruh peptida antimikroba dari amfibi (1900 AMPs) yang telah diteliti

hingga tahun 2013 dan mengklasifikasikannya berdasarkan strukturnya menjadi 100 famili peptida.

Penelitian mengenai senyawa aktif dari lendir anura telah banyak dilakukan (Artika *et al.* 2015a, Artika *et al.* 2015b, Suhyana *et al.* 2015, Xu *et al.* 2015) dan banyak dijadikan dasar dalam pengembangan obat berbasis *antimicrobial peptides* (AMPs). Akan tetapi, pengkajian mengenai sisi genetik dan biologi molekuler dari kodok dan katak asal Indonesia masih sangat jarang, termasuk famili Bufonidae yang banyak tersebar di Indonesia. *D. melanostictus* dan *P. asper* merupakan anggota famili Bufonidae yang menarik untuk dikaji dari sisi genetiknya. Kedua spesies ini memiliki bentuk morfologi yang mirip, dengan kulit berbintil kasar. Perbedaan mendasar terdapat pada garis parental hitam pada bagian kepala. Selain itu, habitat *P. asper* yaitu di area hutan primer maupun sekunder yang dekat dengan aliran sungai (Inger *et al.* 1974), sementara *D. melanostictus* lebih menyukai area sekitar permukiman manusia. *D. melanostictus* sangat mudah beradaptasi dengan lingkungan baru, sehingga jumlahnya relatif melimpah di sekitar pemukiman manusia.

Dalam studi genetika, *gen cytochrome oxidase sub unit I* (COI) merupakan gen penting yang banyak dipelajari. Gen COI ini menyandi protein penting sitokrom *c* oksidase I yang berperan dalam proses transfer elektron pada saat sintesis Adenosine Triphosphate (ATP) dalam mitokondria. Gen COI dilaporkan memiliki potensi laju mutasi yang rendah dibandingkan gen sitokrom *b* (Da Foneska *et al.* 2008). Gen sitokrom *c* oksidase sub unit I (COI) merupakan *DNA barcode* (Hebert *et al.* 2003) yang biasa digunakan sebagai acuan dalam identifikasi

genetik. Gen COI juga banyak digunakan dalam analisis pohon filogenetik, keragaman genetik, sejarah evolusi, maupun genetika populasi. Gen ini berada dalam genom mitokondria (DNA mitokondria). Beberapa keistimewaan DNA mitokondria yaitu diturunkan berdasarkan garis keturunan tetua betina, memiliki laju mutasi yang relatif lebih tinggi dibanding dengan DNA inti (Brown *et al.* 1979), memiliki genom yang relatif pendek sehingga mudah untuk dipelajari (Solihin 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji sisi genetik dari *D. melanostictus* dan *P. asper* yang berupa urutan nukleotida gen COI, keanekaragaman genetik, identifikasi genetik, hubungan kekerabatannya dengan spesies lain dan hubungan kekerabatan intern spesies yang berasal dari lokasi yang berbeda. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah yang dapat dimanfaatkan dalam konservasi genetik, sistematika dan pengelolaan sumberdaya alam.

2. METODOLOGI

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel *D. melanostictus* dilakukan pada malam hari dengan menangkap langsung di habitatnya yaitu di sekitar gedung kampus IPB Dramaga, Bogor dan untuk sampel *P. asper* ditangkap dari kebun percobaan Cikabayan kampus IPB, Dramaga, Bogor. Identifikasi morfologi, dilakukan oleh ahli herpetofauna (Dr. Mirza D. Kusriani), Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata.

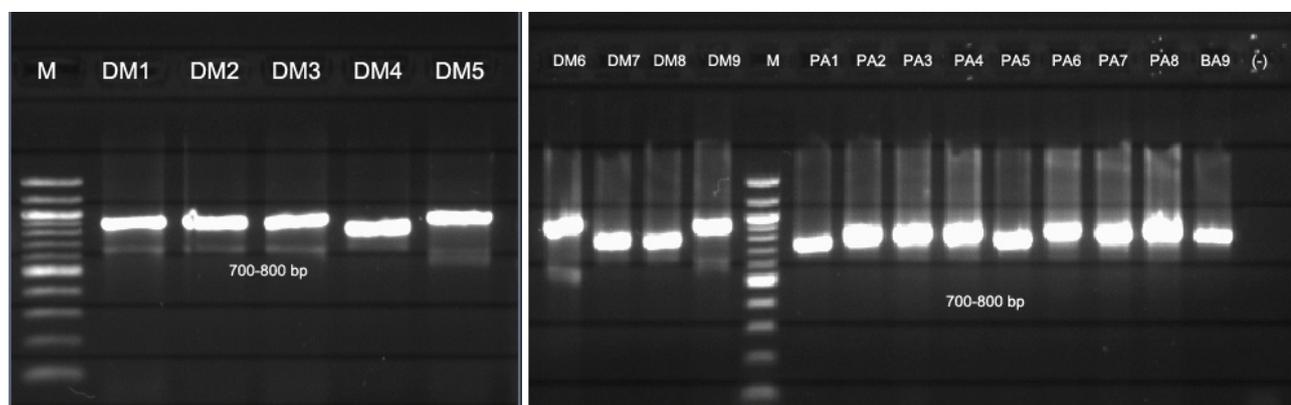
Isolasi DNA dan Amplifikasi

DNA genom diisolasi dari sampel jaringan yang berasal dari ujung jari kaki dengan menggunakan *DNAeasy Blood and Tissue Kit Qiagen*. Fragmen gen COI diamplifikasi menggunakan mesin PCR (*Applied Biosystem*) dengan primer Chmf4 (5'-TYTCWACW AAYCAYAAAGAYATCGG-3') dan Chmr4 (5'-ACYTCRGGRTGRCC RAARAATCA-3') (Chee *et al.* 2011, Arian *et al.* 2016). Profil suhu yang digunakan dalam PCR adalah 95 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 1 menit, *annealing* 50 °C selama 1 menit, *extention* 72 °C selama 1 menit, dan *extention* akhir 72 °C selama 10 menit, jumlah siklus yang digunakan yaitu 35 siklus. Hasil PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 1.5 %, buffer TBE 1x, pewarna gel red dan marker 100 bp DNA ladder (Biolabs Inc.). Sekuensing DNA dilakukan oleh PT. Genetika Science, Jakarta.

Analisis Data

Sekuens *forward* dan *reverse* dipastikan kebenarannya dengan mencocokkan urutan nukleotida dengan elektroforegramnya

menggunakan program MEGA 5 kemudian disejajarkan dengan menggunakan ClustalW. Identifikasi spesies secara genetik dilakukan dengan *Basic Local Search Alignment Tools* (BLAST) pada server NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) dan BOLD (*barcode of life database*). Untuk memperoleh sekuens dari taxa yang memiliki kekerabatan terdekat dengan sekuens sampel dilakukan MOLE-BLAST. Deduksi asam amino gen COI dilakukan dengan menggunakan kode genetik mitokondria vertebrata yang tersedia pada *software* MEGA 5. Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan dua metode: *Neighbor Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) menggunakan MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Model tes digunakan untuk mengetahui model substitusi yang paling sesuai dengan dataset yang digunakan (Nei & Kumar *et al.* 2000). Metode bootstrap dengan 1000 replikasi digunakan untuk mensupport setiap percabangan yang terbentuk pada pohon filogenetik (Nei & Kumar *et al.* 2000). Jarak genetik dikalkulasikan dengan menggunakan metode *pairwise distance* (*p-distance*).



Gambar 1 Hasil elektroforesis amplikon gen COI dari *D. melanostictus* (kode DM) dan *P. asper* (kode PA), dengan marker (kode M)

3. Hasil

Amplikon Gen COI

Hasil amplifikasi gen COI dari 18 sampel *D. melanostictus* dan *P. asper* menggunakan primer universal COI untuk amfibi (ChmF4 dan ChmR4, Che *et al.* 2011) menunjukkan pita DNA pada gel agarose dengan panjang sekitar 700-900 pasang basa (Gambar 1). Konsentrasi DNA hasil amplifikasi sangat tinggi, yang terlihat dari kecerahan pita DNA yang dibandingkan dengan kecerahan pita DNA marker. Konsentrasi amplikon diperkirakan lebih dari 100 ng/μL.

Urutan Nukleotida Fragmen Gen COI

Sepanjang 668 pasang basa DNA fragmen gen COI dari *D. melanostictus* dan *P. asper* berhasil ditentukan urutan nukleotidanya. Sembilan sampel *D. melanostictus* dapat dikelompokkan menjadi satu *haplotype* dan untuk sampel *P. asper* terbagi menjadi lima *haplotype* (Tabel 1). Keanekaragaman *haplotype* dari *P. asper* lebih tinggi dari pada *D. melaonstictus*. Hasil pensejajaran sekuens dari sampel *D. melanostictus* tidak ditemukan adanya titik polimorfisme. Untuk sampel *P. asper* ditemukan adanya 12 titik polimorfisme (Tabel 2).

Tabel 1 Daftar *Haplotype* dari sampel *D. melanostictus* dan *P. asper*

No	Spesies	Haplotype	Kode Sampel
1	<i>D. melanostictus</i>	Haplotype 1	DM1 – DM9
2	<i>P. asper</i>	Haplotype 2	PA1
		Haplotype 3	PA2, PA9
		Haplotype 4	PA3, PA4, PA9
		Haplotype 5	PA5
		Haplotype 6	PA6, PA7

Tabel 2 Posisi titik polimorfisme dari sample *P. asper*

No	Sampel	Posisi Polimorfisme							
		210	222	255	381	390	555	588	636
1	PA1	A	C	C	A	C	G	G	G
2	PA2	.	T	T	G	T	A	A	.
3	PA3	T	.	.	.
4	PA4	T	.	.	.
5	PA5	T	.	.	A
6	PA6	C	T	T	G	T	A	A	.
7	PA7	C	T	T	G	T	A	A	.
8	PA8	T	.	.	.
9	PA9	.	T	T	G	T	A	A	.
Jenis Mutasi		Tv	Ts						
		Syn	Syn	Syn	Syn	Syn	Syn	Syn	Syn

Catatan : Tidak ditemukan titik polimorfisme dari kelompok sampel *D. melanostictus*, Tv (Transversi), Ts (Transisi), Syn (synonymous), NS (non-synonymous).

Tabel 3 Hasil BLAST pada database NCBI dan BOLD

No	Haplotype	BLAST NCBI		
		Kemiripan	Spesies	Kode Akses
1	Haplotype 1	99 %	<i>B. melanostictus</i>	AJ584640.1
2	Haplotype 2	84 %	<i>B. campbelli</i>	JN867958.1
3	Haplotype 3	84 %	<i>B. campbelli</i>	JN867958.1
4	Haplotype 4	84 %	<i>B. campbelli</i>	JN867958.1
5	Haplotype 5	84 %	<i>B. campbelli</i>	JN867958.1
6	Haplotype 6	84 %	<i>B. campbelli</i>	JN867958.1
No	Haplotype	BLAST BOLD SYSTEM		
		Kemiripan	Spesies	Kode Akses
1	Haplotype 1	100 %	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	N/A
2	Haplotype 2	99.23 %	<i>P. asper</i>	N/A
3	Haplotype 3	99.23 %	<i>P. asper</i>	N/A
4	Haplotype 4	99.23 %	<i>P. asper</i>	N/A
5	Haplotype 5	99.23 %	<i>P. asper</i>	N/A
6	Haplotype 6	99.23 %	<i>P. asper</i>	N/A

Hasil BLAST (Tabel 3) pada *database gene bank* (NCBI) menunjukkan sekuens dari sampel *D. melanostictus* 1 sampai 9 identik dengan sekuens *Bufo melanostictus* (kode akses AJ584640.1) dengan tingkat kemiripan mencapai 99 %. Untuk sampel *P. asper*, menunjukkan kemiripan tertinggi (84%) dengan sekuens *B. campbelli* (kode akses JN867958.1). Identifikasi dengan menggunakan *database BOLD System* (*Barcoding of Life Database*, <http://www.boldsystems.org/>) menunjukkan bahwa sampel *D. melanostictus* identik dengan sekuens *Duttaphrynus melanostictus* dengan kemiripan 100 %, dan untuk sampel *P. asper* identik dengan sekuens *P. asper* dengan kemiripan 99.23 %. Akan tetapi kedua sekuens yang mirip tersebut, tidak bisa diakses maupun di *download* datanya, sehingga tidak bisa digunakan sebagai pembandingan dalam pembuatan filogenetik.

Analisis Filogenetik

Diperoleh sebanyak 112 sekuens hasil MOLE-BLAST dari NCBI dengan perbedaan

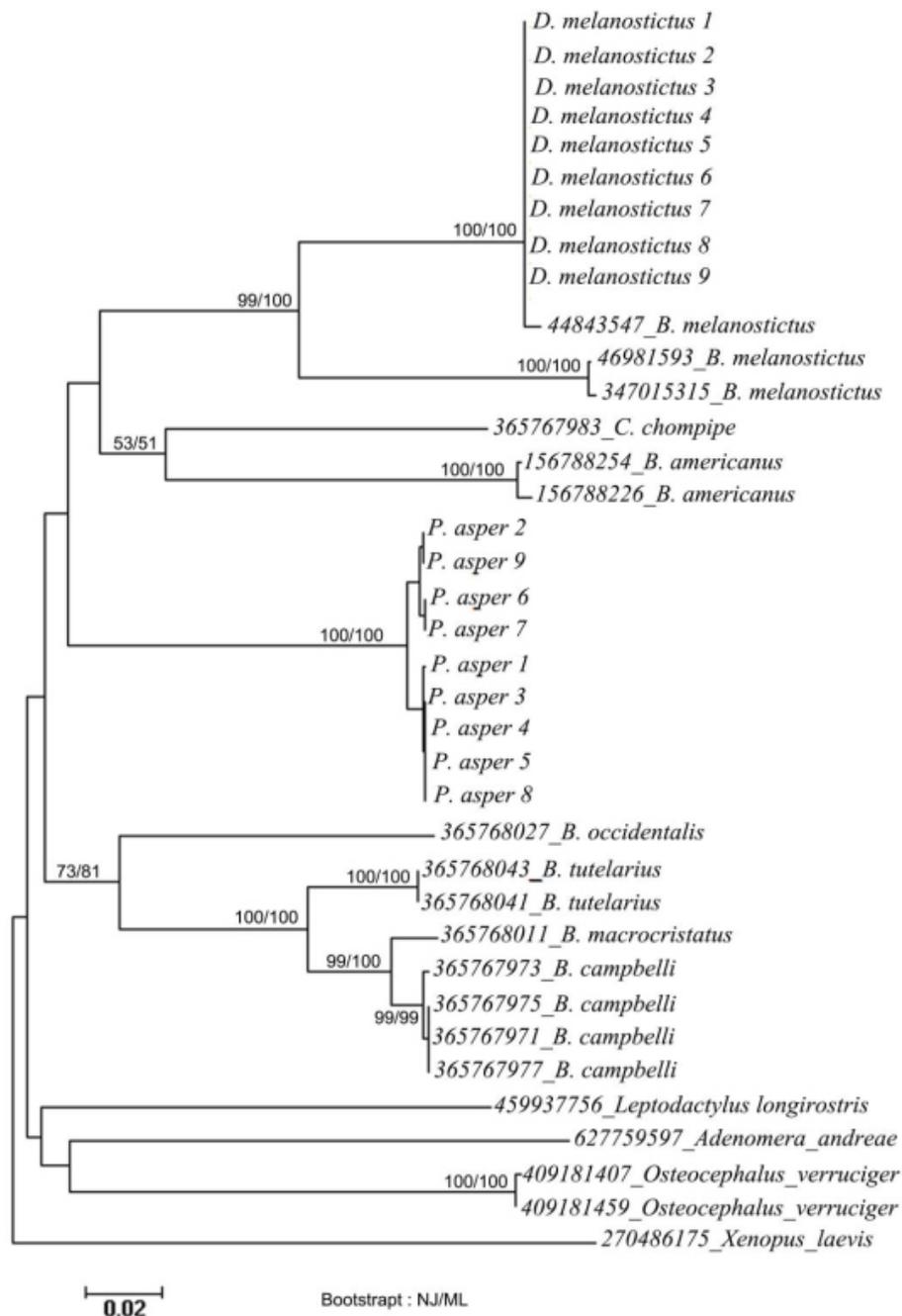
maksimal perbedaan 0.75 yang selanjutnya dipilih 39 sekuens dari Bufonidae (termasuk 18 sekuens sampel penelitian ini) dan juga diambil 4 sekuens dari famili lain yang masih memiliki kemiripan sangat tinggi (hasil MOLE-BLAST) dan satu sekuens dari famili lain yang berkerabat jauh. Sekuens dari famili lain digunakan sebagai *out group*.

Pohon filogenetik berdasarkan metode *Neighbor Joining* (NJ) dan model substitusi standar yaitu Kimura 2 Parameter digunakan dalam analisis filogenetik. Metode bootstrap dengan 1000 replikasi digunakan sebagai parameter untuk menguji pohon filogenetik yang dihasilkan dengan metode NJ dan *Maximum Likelihood* (ML). Hasil pohon filogenetik dengan nilai bootstrap dari metode NJ dan ML disajikan pada Gambar 2 dan jarak genetiknya (*Genetic Distance*) disajikan pada Tabel 4. Selain itu, analisis pohon filogenetik dari kelompok *D. melanostictus* dengan pembandingan data

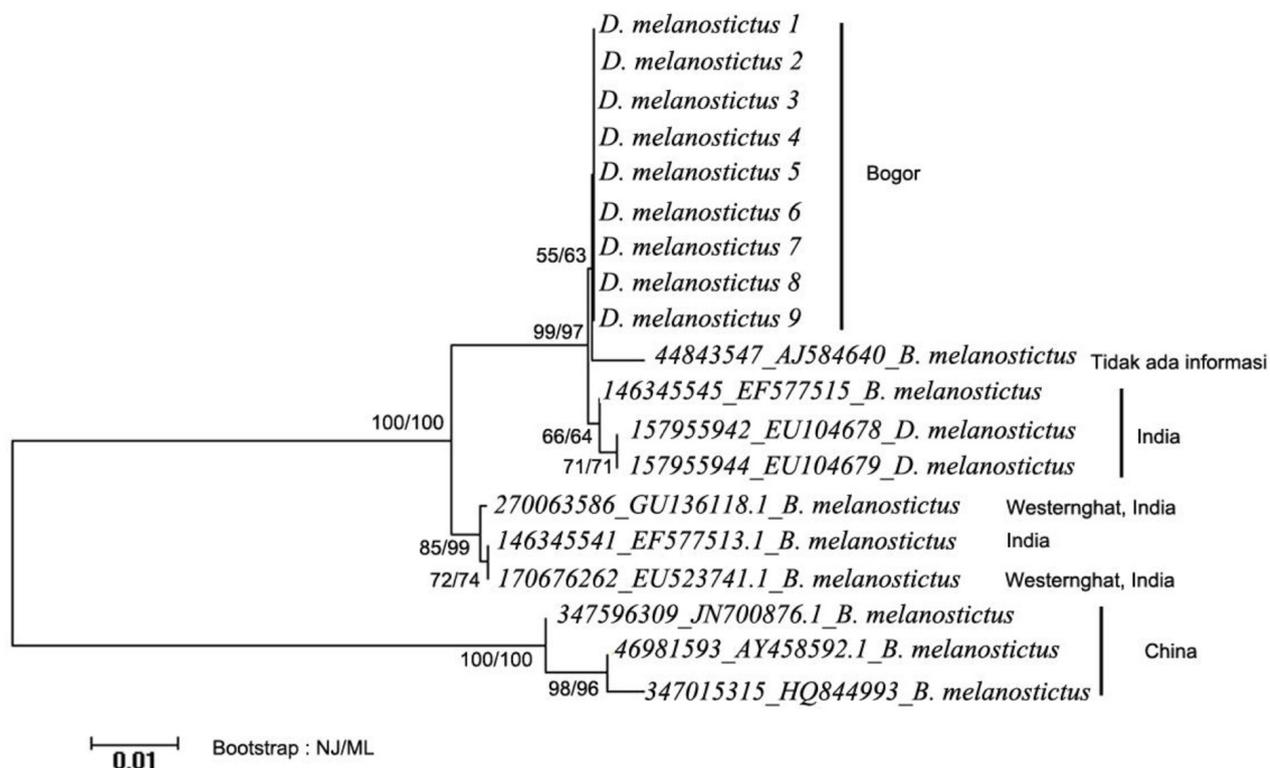
GeneBank yang berasal dari beberapa negara yang berbeda disajikan pada Gambar 3 dan jarak genetiknya pada Tabel 5.

4. PEMBAHASAN

Fragmen gen COI dari semua sampel penelitian ini dapat dengan mudah diamplifikasi dengan menggunakan primer universal COI untuk amfibi. Panjang amplicon yang diperoleh relatif bervariasi antara 700-900 pasang basa. Hal ini menunjukkan kurang spesifiknya



Gambar 2 Pohon filogenetik dengan metode *Neighbour joining* dan *Maximum likelihood* (angka disetiap percabangan adalah nilai Bootstrapt: *Neighbor Joining* /*Maximum Likelihood*)



Gambar 3 Filogenetik kelompok *D. melanostictus* asal bogor dengan sekuens GeneBank dengan asal lokasi yang berbeda-beda

daerah penempelan primer pada DNA *template* dari setiap individu, sehingga produk amplikon yang diperoleh memiliki panjang pasang basa yang berbeda-beda. Akan tetapi, hasil sekuensing menunjukkan bahwa daerah target amplifikasi dari setiap individu adalah fragmen gen yang sama yaitu fragmen gen COI. Selain itu, spesifitas dari primer yang digunakan sangat berkaitan erat dengan sifat universal dari primer ini yang ditujukan untuk dapat mengamplifikasi fragmen gen COI dari berbagai spesies amfibi (Che *et al.* 2011).

Konsentrasi DNA amplikon akan sangat berpengaruh pada hasil sekuensing. Konsentrasi DNA yang disyaratkan dari setiap penyedia jasa sekuensing sangat bervariasi, namun umumnya meminta konsentrasi diatas 100 ng. Berdasarkan

kecerahan pita DNA sampel yang dibandingkan dengan kecerahan pita DNA marker (sesuai protokol produsen), dapat diprediksikan konsentrasi DNA amplikon yang diperoleh adalah lebih dari 97 ng (produk information). Hal ini didasarkan pada kecerahan pita ke 5 dan 10 dari DNA marker yang menunjukkan konsentrasi 97 ng (Sambrock *et al.* 1989), sementara pita DNA sampel, jauh lebih cerah jika dibandingkan DNA marker. Konsentrasi amplikon ini lebih dari cukup untuk dapat digunakan pada proses sekuensing.

Keragaman *haplotype* dari *P. asper* lebih tinggi dari pada keragaman *haplotype* dari *D. melanostictus*. Hanya ditemukan satu *haplotype* dari sembilan individu *D. melanostictus* yang diambil dari sekitar kampus

Tabel 4 Jarak genetik *D. melanostictus* dan *P. asper* dengan data GeneBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>D. melanostictus</i>									
2 <i>P. asper</i>	0.211-0.214								
3 <i>B. melanostictus</i> NCBI	0.136-0.140	0.250-0.253							
4 <i>B. occidentalis</i>	0.23	0.197-0.199	0.27						
5 <i>B. tutelarius</i>	0.224	0.198-0.201	0.242-0.243	0.168					
6 <i>B. macrocristatus</i>	0.24	0.196-0.198	0.237	0.16	0.06				
7 <i>B. campbelli</i>	0.236-0.239	0.191-0.195	0.244-0.247	0.160-0.164	0.063-0.067	0.023			
8 <i>C. chompipe</i>	0.215	0.228-0.235	0.221	0.208	0.198	0.21	0.200-0.204		
9 <i>B. americanus</i>	0.226-0.231	0.214-0.219	0.238-0.245	0.191	0.190-0.194	0.213	0.298-0.203	0.179-0.183	

Tabel 5 Jarak genetik antara kelompok *D. melanostictus* Bogor dengan data GeneBank

	1	2	3	4	5
1 DM_Bogor_clade_1					
2 BM_unknown_clade_1	0.006				
3 BM_India_clade_2	0.002-0.004	0.009-0.011			
4 BM_westernghat_India_clade_3	0.022	0.029	0.020-0.022		
5 BM_China_clade_4	0.130-0.143	0.135-0.148	0.133-0.146	0.119-0.130	

IPB. Tingkat keragaman *haplotype* yang rendah ini menunjukkan bahwa gen COI dari *D. melanostictus* sangat *conserved*, yakni relatif stabil dari satu generasi ke generasi berikutnya. Gen COI merupakan gen yang memiliki laju mutasi sangat rendah (Da Fonseska *et al.* 2008), sehingga variasi genetik dari gen ini sangat sedikit. Selain itu, juga dimungkinkan sembilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini masih berada dalam satu jalur keturunan betina. Sifat dari gen COI yang merupakan salah satu gen dari genom mitokondria adalah diturunkan hanya dari garis keturunan betina tanpa adanya hibridisasi dari genom mitokondria pejantan (Hutchison *et al.* 1974). Populasi *P. asper* yang dikoleksi dari

arboretum IPB, memiliki keragaman *haplotype* yang tinggi, dimana ditemukan 5 *haplotype* dari sembilan sampel yang dikoleksi. Hal ini berbeda dengan keragaman *haplotype* dari gen penyandi *histone* H2A, dari sampel yang sama, *D. melanostictus* memiliki keragaman *haplotype* yang lebih tinggi (dua *haplotype* dari sembilan sampel) (Dailami *et al.* 2016).

Sebanyak delapan titik polimorfisme yang ditemukan berupa mutasi titik yang bersifat *synonymous*, yaitu mutasi yang tidak menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang disandinya. Hal ini dikarenakan, satu jenis asam amino memiliki beberapa jenis kodon, sehingga terjadinya mutasi pada posisi

kodon ke tiga memiliki peluang yang sangat kecil untuk dapat merubah asam amino yang disandinya. Jika ditinjau dari jenis basa purin dan pirimidinnya, dari delapan mutasi titik tersebut, tujuh diantaranya berupa mutasi transisi dan hanya satu yang berupa mutasi transversasi. Mutasi transisi ini terlihat pada posisi nukleotida nomor 222, 255, 381, 390, 555, 588, 636 yang kesemuanya terjadi mutasi dari nukleotida yang memiliki basa purin menjadi nukleotida yang memiliki basa purin atau dari pirimidin ke pirimidin. Sedangkan untuk mutasi pada posisi 210, terjadi mutasi dari basa A (purin) menjadi C (pirimidin) sehingga mutasi ini disebut sebagai mutasi transversasi.

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa semua spesies dari famili Bufonidae yang digunakan dalam pohon ini, berada dalam satu *clade* besar atau bersifat monofiletik. Semua sampel *D. melanostictus* berada dalam satu *clade* terpisah dari spesies lain dari famili Bufonidae, demikian juga dengan *P. asper*. Pada *clade* *D. melanostictus*, terbagi menjadi dua *clade* kecil yang terpisah dengan sangat jelas dengan support bootstrapt 99 % dan 100 % untuk NJ dan ML. Pemisahan ini terjadi dikarenakan adanya perbedaan geografi dari sampel yang digunakan dengan sekuens dari GeneBank. Sampel *D. melanostictus* asal kampus IPB (Indonesia) memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan data GeneBank dengan kode 44843547 dibandingkan dengan sekuens dengan kode 46981593 dan 347015315. Oleh karenanya, perlu dilakukan analisis hubungan filogenetik dari sampel *D. melanostictus* dari kampus IPB dengan sekuens dari lokasi lain yang ada di GeneBank.

Berdasarkan jarak genetiknya, *D. melanostictus* dari Bogor memiliki jarak genetik

terhadap *C. chompipe*, *B. americanus* dan *P. asper* masing-masing 0.215, 0.226-0.231 dan 0.211-0.214. Hal ini berarti bahwa *D. melanostictus* memiliki kekerabatan yang lebih dekat terhadap *P. asper* dibandingkan terhadap *C. chompipe* dan *B. americanus*. Frost *et al.* (2006) memisahkan ketiga spesies (*D. melanostictus*, *P. asper* dan *B. americanus*) menjadi tiga genus yang berbeda, yaitu genus *Duttaphrynus*, *Phyrinoidis*, dan *Anaxyrus*. Sedangkan untuk *Crepidophyrene chompipe*, baru dideskripsikan pada tahun 2007, sehingga tidak termasuk dalam pengelompokan yang dilakukan oleh Frost *et al.* (2006). Meskipun *D. melanostictus* dan *P. asper* memiliki kekerabatan yang lebih dekat, namun kedua spesies ini bersifat *paraphyletic*. Hal ini sesuai dengan pendapat Graybeal (1997) yang menyatakan bahwa kedua spesies tersebut adalah *paraphyletic* berdasarkan gen 12S, 16S, *Cytochrome b* dan *c-mos* (n-DNA).

Pada *clade* selanjutnya, terlihat bahwa *B. occidentalis*, *B. tutelaris*, *B. macrocristatus*, dan *B. campbelly* berada dalam satu *clade* yang sama atau bersifat monophyletic. Jarak genetik dari *B. occidentalis* terhadap *B. tutelaris*, *B. macrocristatus*, dan *B. campbelly* masing-masing yaitu 0.168, 0.160 dan 0.160-0.164. Pada penamaan baru, keempat spesies tersebut dikelompokkan dalam satu genus *Cranopsis* (Frost *et al.* 2006). Jarak genetik dari empat spesies ini yang masih berada dalam satu genus, jauh lebih kecil jika dibandingkan 4 spesies (*D. melanostictus*, *C. chompipe*, *B. americanus* dan *P. asper*) yang berasal dari empat genus yang berbeda. Dari beberapa informasi tersebut, terlihat bahwa, pohon filogenetik dari beberapa spesies dalam *family* Bufonidae yang dibangun dengan menggunakan sekuens gen COI, memiliki hubungan genetik yang sesuai dengan

klasifikasi yang dilakukan berdasarkan data morfologi dan kombinasi antara gen 16S, 12S dan *Cytochrome b* (Frost *et al.* 2006). Oleh karenanya, dapat dikatakan bahwa, gen COI dari famili Bufonidae, dapat mewakili ketiga gen di atas untuk menjelaskan sejarah evolusi atau hubungan kekerabatan dari anggota Bufonidae sampai taraf spesies. Akan tetapi, sedikitnya sekuens COI yang tersedia pada data GeneBank, menyebabkan analisis filogenetik dari seluruh spesies anggota famili Bufonidae, belum dapat dilakukan. Sehingga perlu dilakukan sekuensing dari gen COI dari spesies lain dalam famili Bufonidae dan dibandingkan dengan data gen lain yang ada di GeneBank.

Pohon Filogenetik dari kelompok *D. melanostictus* asal kampus IPB dengan sekuens dari lokasi lain, menunjukkan adanya 4 *clade* yang berbeda. *Clade* pertama merupakan kelompok *D. melanostictus* dari Bogor dengan satu sekuens dari genebank, namun sekuens tersebut tidak diketahui asal lokasinya. Berdasarkan pohon filogenetik tersebut, terlihat bahwa, sekuens *D. melanostictus* dari Bogor memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan sekuens yang berasal dari India, dibandingkan dengan sekuens yang berasal dari China. Jarak genetik antara sampel dari Bogor dengan sekuens dari India (*clade* 2) yaitu antara 0.002-0.004. Nilai ini sangat kecil jika dibandingkan dengan jarak antara sampel Bogor dengan sekuens China yang mencapai 0.130-0.143. Hal ini menunjukkan adanya aliran genetik (*genetic drift*) antara *D. melanostictus* asal Bogor dan India. Ada kemungkinan bahwa *D. melanostictus* Bogor merupakan hasil introduksi dari India. Hal ini didasarkan pada hipotesis Zhang *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa, asal muasal dari penyebaran anura yaitu

dari Afrika dan India pada masa Triassic sampai pada awal masa Jurassic (160-240 juta tahun yang lalu).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada mahasiswa HIMAKOVA IPB, yang membantu dalam koleksi sampel. Terima kasih juga kepada asisten peneliti Laboratorium Bakteriologi Molekuler, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Majid Khoeri dan Wisnu Tafroji yang telah membantu dalam pengerjaan penelitian laboratorium.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Arian P, Artika IM, Falah S. 2016. Amplification and analysis of cytochrome oxidase I of *Polypedates leucomystax* from Bogor Agricultural University Area. *Curr Biochem* 3: 13-19
- Artika IM, Pinontoan S, Kusri MD. 2015a. Antifungal activity of skin secretion of bleeding toad *Leptophrine cruentata* and javan tree frog *Rachophorus margaritifer*. *Am J Biochem Biotechnol* 11: 5-10
- Artika IM, Pinontoan S, Kusri MD. 2015b. Antifungal activity of skin secretion of bleeding toad *Leptophrine cruentata* and javan tree frog *Rachophorus margaritifer*. *Am J Biochem Biotechnol* 11: 127-131
- BAPPENAS (Badan Perencanaan Pembangunan Nasional). 1993. *Biodiversity Action Plan for Indonesia*. Jakarta: Ministry of National Development Planning/National Development Planning Agency. 141 p.
- Brown WM, George MJR, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. (primates/restriction endonuclease cleavage maps/gel electrophoresis/DNA melting). *Proceeding Natural Academi of Science. USA. Genetics*. 76(4):1967-1971.

- Che J, Chen HM, Yang JC, Jin JQ, Jiang K, Yuan ZY, Murphy RW, Zhang YP. 2011. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011. 03090.
- Da Fonseska RR, Johnson WE, Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondria genome. *BMC Genomic*. doi:10.1186/1471-2164-9-119.
- Dailami M, Artika IM, Kusri MD, Safari D. 2016. Analysis and prediction of some histone-derived antimicrobial peptides from toads *Duttaphrynus melanostictus* and *Phyrinoidis asper*. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*. 5(2): 67-76, ISSN 2302-4690.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Has A, Haddad CLFB, De Sa' RO, Channing A, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JD. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. No. 297. 370 pp.
- García-Muñoz E, Gilbert JD, Parra G, Guerrero F. 2010. Wetlands classification for amphibian conservation in Mediterranean landscapes. *Biodiversity Conservation*. 19(3): 901–911.
- Graybeal A. 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 119:297-338
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B*, 313-321.
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*. 251:536–8.
- Inger RF, Voris HK, Voris HH. 1974. Genetic variation and population ecology of some Southeast Asian frogs of the genus *Bufo* and *Rana*. *Biochemical Genetics*, 12(2), 121-145.
- Kusri MD. 2007. Konservasi Amfibi Di Indonesia: Masalah Global Dan Tantangan. *Media Konservasi*. XII(2):89-95.
- Nei M dan Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Pukala TL, Bowie JH, Maselli VM, Musgrave IF, Tyler MJ. 2006. Review: Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural Product Reports*. doi: 10.1039/b512118n
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)*. 10.51-10.67
- Solihin DD. 1994. Peranan DNA mitokondria dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Jurnal Hayati*. 1(1):1-4, ISSN 0854-8587.
- Suhyana J, Artika IM, Safari D. 2015. Activity of skin secretions of frog *Fejervarya limnocharis* and *Limnonectes macrodon* against *Streptococcus pneumoniae* multidrug resistant and molecular analysis of species *F. limnocharis*. *Curr Biochem* 2: 90-103
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary Distance and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Xu X and Lai R. 2015. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*. 115 (4):1760-1846. doi: 10.1021/ cr4006704
- Zhang P, Zhou H, Chen YQ, Liu YF, Qu LH. 2005. Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians. *Systematics Biology*. 54(3):391–400, doi: 10.1080/10635150590945278